

Molekularbiologisches Praktikum

WS 2013/2014

in vitro – Transkription

Die Vorbesprechungen bzw. Antestate finden im Seminarraum (NC 6/174) des Lehrstuhls für Biochemie I – Rezeptorbiochemie statt:

Mo. 7. Oktober 2013 9⁰⁰ Uhr **s.t.**

Do. 10. Oktober 2013 9⁰⁰ Uhr **s.t.**

Mo. 14. Oktober 2013 9⁰⁰ Uhr **s.t.**

Mo. 21. Oktober 2013 9⁰⁰ Uhr **s.t.**

Betreuer:

Simon Kösters
Lehrstuhl für Biochemie I
NC 6 Raum 131
simon.koesters@rub.de

Kevin Gottschling
Lehrstuhl für Biochemie I
NC 6 Raum 131
kevin.gottschling@rub.de

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Zielsetzung	1
1.2 Promotoren	1
1.3 Gensequenzen	2
1.4 Plasmide	3
2. Molekularbiologische Methoden	4
2.1 HEK-S100-Extrakt	4
2.1.1 Theoretischer Hintergrund	4
2.1.2 Lösungen für den HEK-S100-Extrakt	5
2.2 Proteinbestimmung mittels der Bradford-Methode	6
2.2.1 Theoretischer Hintergrund	6
2.2.2 Lösungen zur Proteinbestimmung nach Bradford	7
2.3 <i>in vitro</i> -Transkription	8
2.3.1 Theoretischer Hintergrund	8
2.3.2 Lösungen für die <i>in vitro</i> -Transkription	9
2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	10
2.4.1 Theoretischer Hintergrund	10
2.4.2 Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese	12
3. Radioaktives Arbeiten	13
3.1 Eingesetzte Radioaktivität	13
3.2 Umgang mit Radioaktivität	13
4. Versuchsdurchführung	14
4.1 S100-Extraktion aus HEK-Zellen	14
4.2 Proteinbestimmung mittels der Bradford-Methode	15
4.3 <i>in vitro</i> -Transkription	16
4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese	17
5. Literatur	18
6. Anhang	19
6.1 Protokolle	19
6.1.1 Allgemeine Hinweise	19
6.1.2 Gliederung des Protokolls	19
6.1.3 Titelblatt	20
6.1.4 Inhaltsverzeichnis	20
6.1.5 Zusammenfassung	20
6.1.6 Einleitung	20
6.1.7 Ergebnisse	21
6.1.8 Diskussion	21
6.1.9 Abbildungen	21
6.1.10 Tabellen	22

1. Einleitung

1.1 Zielsetzung

Ziel des Versuches ist die qualitative Untersuchung und Bewertung verschiedener Promotoren. Dazu werden verschiedene Gene mit Hilfe eines Extraktes aus HEK-Zellen (Embryonale Nierenzellen; s. Kapitel 2.1.1) *in vitro* transkribiert und gleichzeitig radioaktiv markiert. Die erhaltenen Transkripte sollen anschließend in einem denaturierenden Polyacrylamidgel (PAA) elektrophoretisch aufgetrennt und analysiert werden.

1.2 Promotoren

Die zu transkribierenden Gene wurden einschließlich ihrer Promotoren in Vektoren kloniert. In Abbildung 1.1 ist die Struktur eines durch die RNA-Polymerase III transkribierten Gens schematisch dargestellt. Die Promotoren der RNA-Polymerase III lassen sich in mindestens drei unterschiedliche Gruppen einteilen, wobei die meisten durch geninterne Regionen, sogenannte ICRs (*Internal Control Regions*), reguliert werden:

Promotoren des Typs I besitzen ICRs im Bereich von +50 bis +90 nt (bezogen auf den Transkriptionsstartpunkt +1). An diese bindet vor der Transkriptionsinitiation zunächst Transkriptionsfaktor III A (TFIIIA), wodurch zusammen mit anderen Transkriptionsfaktoren ein Initiationskomplex entsteht, welcher dann die RNA-Polymerase III rekrutiert. Zur Gruppe dieser Typ I-Promotoren gehört zum Beispiel der Promotor des Gens der 5S rRNA.

Typ II-Promotoren besitzen ebenfalls eine geninterne Kontrollregion, welche aus einer A-Box (+10 nt) und einer B-Box (+50 nt) besteht. Beide sind ca. 10 nt lang und liegen 30 bis 40 nt voneinander entfernt. Durch die Bindung von Transkriptionsfaktor III C (TFIIIC) an diese Domänen wird die Assoziation von Transkriptionsfaktor III B (TFIIIB) an eine TATA-Box-ähnliche Sequenz (-30 nt) und damit die Anlagerung der RNA-Polymerase III bewirkt. Zu den Typ II-Promotoren gehören beispielsweise die Promotoren der tRNA-Gene, des 7SL-Gens und der viralen EBER 2-RNA-Gene I und II.

Bei den Promotoren des Typs III rekrutiert sich im Gegensatz zu den ersten beiden Promotor-Typen der Initiationskomplex genextern, ist aber den Initiationskomplexen der RNA-Polymerase II sehr ähnlich. Zusätzlich existieren die Sequenzelemente DSE (-220 nt), PSE (-50 nt) und die TATA-Box (-30 nt). Zu den Promotoren des Typs III gehören die der U6 snRNA, der 7S K snRNA und der MRP-RNA.

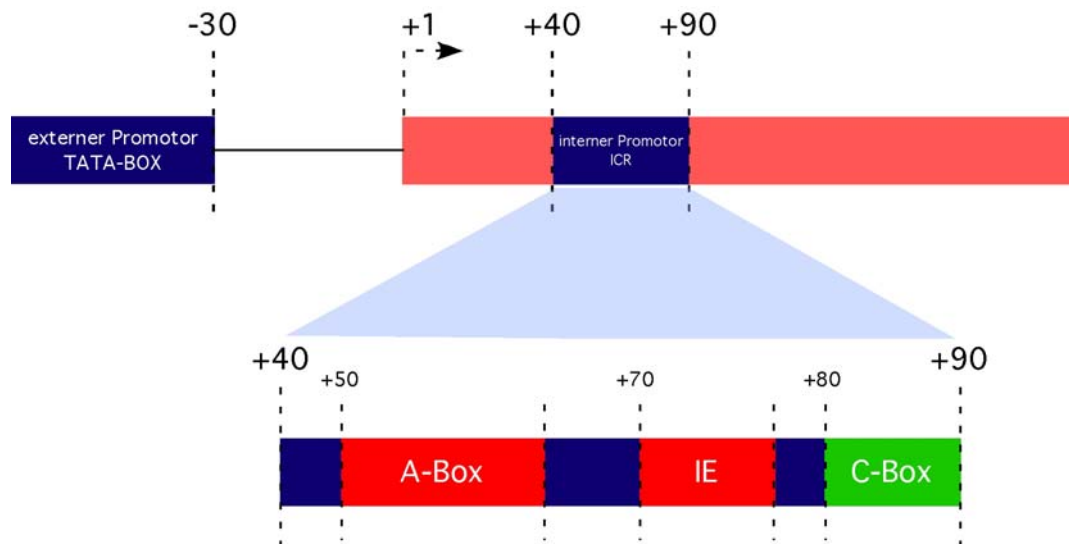


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung eines durch die RNA-Polymerase III transkribierten Gens und seiner Promotorenbereiche.

1.3 Gensequenzen

Die in der *in vitro*-Transkription zu transkribierenden Gene sind eukaryotischen und viralen Ursprungs. Die 7SL-RNA ist Teil des Signalerkennungspartikels (SRP), welches an die Signalsequenz der durch die Ribosomen erzeugten Proteine bindet. Sie unterstützt dabei die Bindung des SRP an das Ribosom durch Interaktion mit der ribosomalen RNA.

Die 7S K snRNA ist durch Interaktion mit dem positiven Transkriptionselongationsfaktor p-TEFb an der Regulation der Transkription durch die RNA-Polymerase II beteiligt.

Während der Latenzzeit einer Epstein-Barr-Virus-Infektion werden unter anderem die Gene der EBER 1- und EBER 2-RNA exprimiert. Die Transkripte sind 166 nt und 172 nt lang und kodieren nicht für Proteine (Rosa et al., 1981). Die genaue Funktion der EBER 1- und EBER 2-RNA ist noch unklar. Da sie aber Ähnlichkeiten mit den kleinen RNAs VA I und VA II des Adenovirus haben (Rosa et al., 1981), könnte eine plausible Funktion die Modulierung der interferonvermittelten Antivirus-Antwort sein.

Eukaryotische Gene und deren primäre Transkripte (prä-mRNA oder hnRNA) bestehen aus alternierenden Exons und Introns. Introns sind nicht translatierte Genabschnitte von 100 bis 20.000 bp Größe. Prä-mRNA wird durch das Herausschneiden von intervenierenden Sequenzen (Introns), dem das Verbinden der flankierenden Sequenzen (Exons) folgt, posttranskriptional prozessiert. Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet und durch das sog. Spleißosom katalysiert. SnRNPs sind Komplexe aus Proteinen und kleinen nukleären RNAs (snRNAs), die in einer hohen Kopienzahl im eukaryotischen Zellkern vorkommen. Zu diesen gehören die U1, die U2, U4 und U6, sowie die U5 snRNA.

1.4 Plasmide

Mittels Vektoren lassen sich Gene und ihre Promotoren in natürliche (*in vivo*) oder künstliche (*in vitro*) Systeme einführen. Diese Gene werden von den DNA-Polymerasen der Wirtszelle repliziert und liegen in der Zelle je nach Art des Replikationsursprungs in 50 (*low copy*-Plasmide) bis 1000 Kopien (*high copy*-Plasmide) vor. Plasmide sind zirkuläre DNA-Moleküle, die ursprünglich nur die Fähigkeit besaßen, sich zwischen zwei Zellen auszutauschen und eine durch ein auf dem Plasmid liegendes Gen vermittelte Eigenschaft zu übertragen. Für die Nutzung in der Biotechnologie sind die ursprünglichen Plasmide stark verändert worden. Neben dem Replikationsursprung (*ori*) enthält der Vektor zusätzlich eine Antibiotikaresistenz für die Selektionierung der Kolonien sowie eine *multiple cloning site* (MCS). Die MCS enthält bekannte Restriktionsschnittstellen (meist singuläre, d.h. sie kommen nur einmal im Vektor vor) um Fremd-DNA zu klonieren (s. Abb. 1.2). Bei der Konstruktion von Vektoren ist darauf zu achten, dass der Promotor des zu transkribierenden Gens mit den Polymerasen und Transkriptionsfaktoren der Wirtszelle assoziieren kann. Eukaryotische wie virale Promotoren werden durch die Transkriptionsfaktoren der eukaryotischen RNA-Polymerase III erkannt.

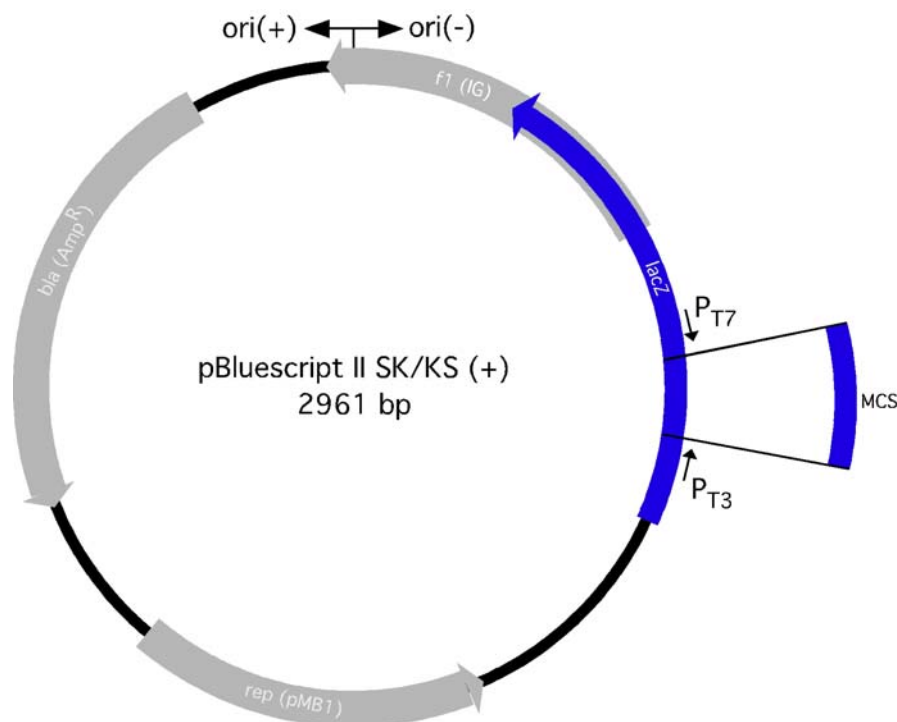


Abbildung 1.2: Schematische Zeichnung des pBluescript-Vektors. *ori* = Replikationsursprung; Amp^R = Ampicillin-Resistenz; LacZ = α -Peptid (1-146 nt der β -Galactosidase) zur Komplementation der β -Galactosidase δ M15 (blau-weiße Selektion); T7 + T3 = Phagenpromotoren und Sequenzierprimer-Bindestellen. Zwischen dem T7 und dem T3 Promotor liegt die MCS (*multiple cloning site*).

2. Molekularbiologische Methoden

2.1 HEK-S100-Extrakt

2.1.1 Theoretischer Hintergrund

Für die geplante *in vitro*-Transkription werden sowohl die RNA-Polymerase III als auch deren Transkriptionsfaktoren benötigt, welche in nativer Form aus HEK-Zellen durch einen sogenannten S100-Extrakt isoliert werden sollen.

Bei den HEK-Zellen handelt es sich um eine Zelllinie welche am Anfang der 1970er Jahre aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (*Human Embryonic Kidney cells*) kultiviert wurde, und daher ideal für Untersuchung von eukaryotischen und menschlichen Proteinen und zellphysiologischen Prozessen sind. Diese Zellen und alle daraus abgeleiteten Zelllinien besitzen eine unbegrenzte Fähigkeit zur Zellteilung, lassen sich sehr leicht in Zellkultur halten und haben sich daher zu einem sehr verbreiteten eukaryotischen Standardsystem entwickelt.

Um die oben genannten Proteine aus den HEK-Zellen isolieren zu können, müssen die Zellen zunächst aufgebrochen werden. Eine chemische Lyse mittels denaturierender Stoffe wie SDS oder Triton X-100 ist nicht möglich, da die benötigten Proteine durch diese Substanzen zerstört und somit für die *in vitro*-Transkription unbrauchbar würden. Um dieses Problem zu umgehen, werden die Zellen stattdessen in hypotoner Lösung (Lösung A) zum Schwellen gebracht und anschließend mittels eines *Douncers* mechanisch aufgeschlossen. Die Größe des Pistills wird dabei so gewählt, daß die Zellkerne nicht zerstört werden, und zusätzlich werden diese auch noch durch $MgCl_2$ (Lösung B) stabilisiert, um eine Störung der Proteinaufreinigung durch freigewordene genomische DNA zu verhindern. Da allerdings sowohl die RNA-Polymerase III als auch ihre Transkriptionsfaktoren im Zellkern lokalisiert sind, müssen diese Proteine in einem zweiten Arbeitsschritt freigesetzt werden. Dieses geschieht mittels Ultrazentrifugation, bei der die im Nucleus vorliegenden Proteine aus den Kernen herausgedrückt werden und somit anschließend in dem wässrigen Überstand gelöst sind.

Nach der Isolierung der Proteine folgt eine Dialyse gegen Puffer D, welche zwei Funktionen erfüllt: Zum einen wird durch diesen Schritt eine Aufkonzentrierung der Proteine in der Lösung bewirkt. Zum anderen wird dem S100-Extrakt durch die Dialyse Glycerin zugeführt, durch welches ein Einfrieren der Lösung möglich wird, ohne dabei die Proteine durch die Kristallbildung des Wassers zu zerstören. Der letztgenannte Grund ist in diesem Fall besonders bedeutsam, da aus zeitlichen Gründen im Praktikum die eigentliche *in vitro*-Transkription erst am Folgetag durchgeführt werden kann.

2.1.2 Lösungen für den HEK-S100-Extrakt

1× PBS-Puffer

		Rezept:	
150 mM	NaCl	20× PBS	5 ml
8 mM	KH ₂ PO ₄	H ₂ O	ad 100 ml
2 mM	Na ₂ HPO ₄		

10× Lösung A

		Rezept:	
100 mM	HEPES/KOH pH = 7,9	1 M HEPES/KOH pH = 7,9	10 ml
15 mM	MgCl ₂	1 M MgCl ₂	1,5 ml
100 mM	KCl	1 M KCl	10 ml
		H ₂ O	ad 100 ml

1× Lösung A (Schwellpuffer)

		Rezept:	
10 mM	HEPES/KOH pH = 7,9	10× Lösung A	10 ml
1,5 mM	MgCl ₂	1 M DTT	500 µl
10 mM	KCl	H ₂ O	ad 100 ml
0,5 mM	DTT		

10× Lösung B (Stabilisierungspuffer)

		Rezept:	
300 mM	HEPES/KOH pH = 7,9	1 M HEPES/KOH pH = 7,9	30 ml
30 mM	MgCl ₂	1 M MgCl ₂	3 ml
1,4 M	KCl	3 M KCl	46,7 ml
		H ₂ O	ad 100 ml

10× Lösung D

		Rezept:	
200 mM	HEPES/KOH pH = 7,9	1 M HEPES/KOH pH = 7,9	20 ml
1 M	KCl	3 M KCl	33,3 ml
2 mM	EDTA	0,2 M EDTA	1 ml
		H ₂ O	ad 100 ml

1× Lösung D (Dialysepuffer)

		Rezept:	
20 mM	HEPES/KOH pH = 7,9	10× Lösung D	100 ml
100 mM	KCl	1 M DTT	500 µl
0,2 mM	EDTA	50% (v/v) Glycerin	400 ml
0,5 mM	DTT	H ₂ O	ad 1000 ml
20% (v/v)	Glycerin		

2.2 Proteinbestimmung mittels der Bradford-Methode

2.2.1 Theoretischer Hintergrund

Im Mittelpunkt der Proteinbestimmung nach Bradford (Bradford, 1976) stehen keine Kupfer-Ionen, wie es in zahlreichen anderen Proteinfärbeverfahren der Fall ist (z.B. Bestimmungen nach Biuret, Lowry oder beim Bicinchoninsäure (BCA)-Assay), sondern blaue Säurefarbstoffe, die als Coomassie-Brilliantblau bezeichnet werden. Häufig wird der in Abbildung 2.1 dargestellte Vertreter, das Coomassie-Brilliantblau G 250, verwendet. In Gegenwart von Proteinen und im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Coomassie-Brilliantblaus G 250 von 465 zu 595 nm. Der Grund dafür ist vermutlich die Stabilisierung des Farbstoffs in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form durch Komplexbildung zwischen Farbstoff und Protein. Der Farbstoff bindet dabei recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitengruppen der Proteine. Am wichtigsten sind die Wechselwirkungen mit Arginin, weniger die mit Lysin, Histidin, Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin.

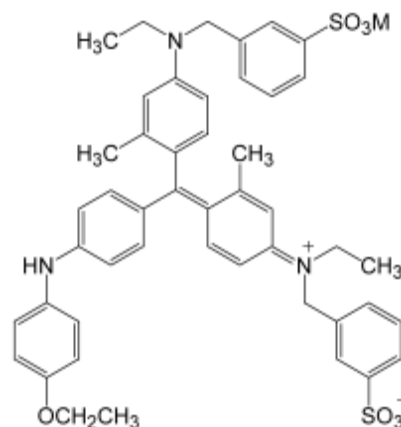


Abbildung 2.1: Strukturformel des Coomassie-Brilliantblaus G 250.

Da die Bradford-Methode mit einer Protein-Nachweisgrenze von 1 – 15 µg eine der empfindlichsten quantitativen Färbemethoden ist, wird sie häufig auch zur Anfärbung von Proteinen in Elektrophoresegelele verwendet. Weiterhin ist diese Methode auch die einfachste, da die Stammlösung, bestehend aus Farbstoff, Ethanol und Phosphorsäure, in einem Verhältnis von 20 bis 50:1 zur Probelösung hinzugegeben wird und nach 10minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mit der Vermessung der Absorption bei 595 nm begonnen werden kann. Von Vorteil ist auch, daß eine Reihe von Substanzen, die beispielsweise den Lowry- oder BCA-Assay stören (z.B. EDTA, Ammoniumsulfat, Natriumacetat, u.v.m.), das Ergebnis nicht beeinträchtigen. Insbesondere ist hier die Toleranz gegenüber Reduktionsmitteln zu nennen! Hingegen stören alle Substanzen, die das

Absorptionsmaximum von Coomassie-Brilliantblau beeinflussen, und das ist aufgrund der Unspezifität der Wechselwirkungen manchmal vorher kaum abzuschätzen. Definitiv störend wirken jedoch Triton X-100 und SDS in Konzentrationen höher als 0,5% bzw. 0,1% sowie Natriumdesoxycholat.

Der wohl größte Nachteil des Bradford-Assays besteht darin, daß gleiche Mengen an verschiedenen Standardproteinen erhebliche Differenzen in ihren resultierenden Absorptionskoeffizienten verursachen können. Die Subjektivität dieser Färbemethode ist somit beträchtlich und verglichen mit anderen etwas aufwendigeren Färbemethoden am größten.

Bei der Auswertung einer Proteinbestimmung nach Bradford gilt es desweiteren unbedingt zu beachten, daß die zugrundeliegende Funktion nicht-linear verläuft! Auch wenn eine gemessene Kalibrierkurve im Bereich niedriger Konzentrationen noch relativ linear erscheint, so flacht sie bei höheren Proteingehalten doch zusehends ab. Um folglich möglichst präzise Ergebnisse zu erhalten, sollte der Proteingehalt der gemessenen Probe innerhalb der gemessenen Werte der Kalibrierkurve liegen und nicht nur auf Grundlage weniger Werte errechnet werden.

2.2.2 Lösungen zur Proteinbestimmung nach Bradford

5× Bradford-Reagenz

Rezept:

400 µM	<i>Serva Blue G</i>	<i>Serva Blue G</i> (kristallin)	10,25 mg
25% (v/v)	Ethanol	Ethanol (p.a.)	7,5 ml
50% (v/v)	Ortho-Phosphorsäure	Ortho-Phosphorsäure	15 ml
		H ₂ O	ad 30 ml

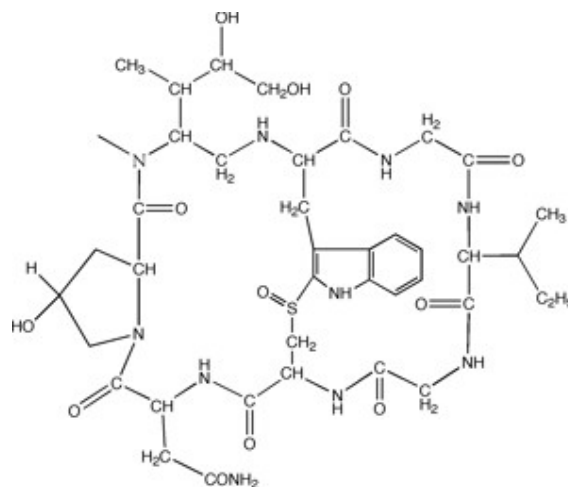


Abbildung 2.2: Strukturformel von α -Amanitin (aus: Voet; „Lehrbuch der Biochemie“; upgrade edition 2002)

2.3 *in vitro*-Transkription

2.3.1 Theoretischer Hintergrund

Bei der *in vitro*-Transkription erstellt die durch den HEK-S100-Extrakt isolierte RNA Polymerase III RNA-Transkripte von den in die Vektoren inklonierten Genen. Neben dem Enzym, seinen Co-Faktoren und dem zu transkribierenden Gen hängt die Reaktion zusätzlich von der chemischen Umgebung ab. Aus diesem Grund werden im Versuch verschiedene Transkriptinpuffer verwendet, die für die jeweiligen Gene die optimalen Bedingungen schaffen.

Ebenfalls eine essentielle Bedeutung hat die Zugabe von α -Amanitin (s. Abb. 2.2). Dieses Toxin wird von dem grünen Knollenblätterpilz (*Amanita phalloides*; s. Abb. 2.3) synthetisiert. Es inhibiert selektiv die eukaryotischen RNA-Polymerasen II und III und blockiert so die RNA-Synthese. Für eine vollständige Inhibierung der RNA-Polymerase II werden 10^{-9} mol/l α -Amanitin benötigt. Die RNA-Polymerase III wird dagegen erst durch eine Konzentration von 10^{-7} mol/l α -Amanitin gehemmt. Während der *in vitro*-Transkription sollen Promotoren der RNA-Polymerase III selektiv untersucht werden. Um nun ausschließlich die Transkription der RNA-Polymerase III zu gewährleisten, wird durch kontrollierte Zugabe des α -Amanitins (10^{-8} mol/l) die RNA-Polymerase II vollständig gehemmt. Die eingesetzte Konzentration reicht für eine Blockade der RNA-Polymerase III jedoch nicht aus.

Das Abstoppen der *in vitro*-Transkription erfolgt durch Zugabe des PK-Puffers, welcher das Enzym „Proteinase K“ beinhaltet. Dieses Enzym zersetzt andere Proteine (u.a. die RNA-Polymerase) und stoppt auf diese Weise die Reaktion ab. Anschließend erfolgt eine Aufreinigung der Transkripte durch eine Nukleinsäurefällung, um die synthetisierten Transkripte von einem Großteil der noch freien Nukleotide zu trennen.

Die Detektion der Transkripte erfolgt über den Einbau von radioaktiv markierten Uridinmonophosphaten (UMPs). UMP entsteht während des Einbaus in die Nukleinsäure aus UTP (s. Abb. 2.4), da bei dieser Reaktion die γ - und β -Phosphate abgespalten werden. Das α -Phosphat ist durch ein radiaktives ^{32}P ersetzt, wodurch der Einbau des radioaktiven Nuklids in die Transkripte gewährleistet wird.

Die Detektion dieses ^{32}P kann durch eine Phosphoimagerplatte (Fuji) oder einen Röntgenfilm erfolgen. Beim Phosphoimagerverfahren werden durch die auftreffende Energie Elektronen in einen metastabilen Zustand angehoben. Durch Belichten der Platte mittels eines Lasers fallen die Elektronen wieder in ihren Grundzustand zurück und emittieren elektromagnetische Strahlung. Diese wird von einem Detektor registriert und digitalisiert. Dieses Verfahren empfiehlt sich auf Grund der kurzen Belichtungszeiten von ca. 1 h. Röntgenfilme dagegen müssen bei -80°C bis zu 6 Tage „belichtet“ werden, um nach der Entwicklung deutlich sichtbare Banden aufzuweisen.



Abbildung 2.3: *Amanita phalloides* (Knollenblätterpilz). Blätterpilz des Laubwaldes mit grünlichem Hut, weißen Lamellen (Blättern), deutlicher weißer Manschette, knolligem Stielende, welches aus lappiger und häutiger Tasche wächst. Vorkommen: Juli – Oktober, einzeln oder in Gruppen im Laubwald und Parkanlagen, besonders unter Eichen und Rotbuchen, selten unter Linden oder im Nadelwald, auf nährstoffreichen Böden, in ganz Mittel-, Süd- und Teilen Nordeuropas, Schottland, häufig. Einstufung: Tödlich giftig. Quelle: <http://www.natur-lexikon.com/Texte/FM/001/00029/fm00029.html>

2.3.2 Lösungen für die *in vitro*-Transkription

10× Transkriptionpuffer 1

140 mM	HEPES/KOH pH 7,9
500 mM	KCl
15 mM	MgCl ₂

Rezept:

1 M HEPES/KOH pH 7,9	1,4 ml
1 M KCl	5 ml
1 M MgCl ₂	150 µl
H ₂ O	ad 10 ml

10× Transkriptionpuffer 2

140 mM	HEPES/KOH pH 7,9
800 mM	KCl
50 mM	MgCl ₂

Rezept:

1 M HEPES/KOH pH 7,9	1,4 ml
1 M KCl	8 ml
1 M MgCl ₂	500 µl
H ₂ O	ad 10 ml

PK-Puffer

10 mM	Tris/HCl pH 7,9
10 mM	NaCl
1 mM	EDTA
0,5 mg/ml	Proteinase K
0,4% (v/v)	SDS
0,2 mg/ml	tRNA

Rezept:

1 M Tris/HCl pH 7,9	100 µl
5 M NaCl	20 µl
0,2 M EDTA	50 µl
Proteinase K (kristallin)	5 mg
10% SDS	400 µl
tRNA (kristallin)	2 mg
H ₂ O	ad 10 ml

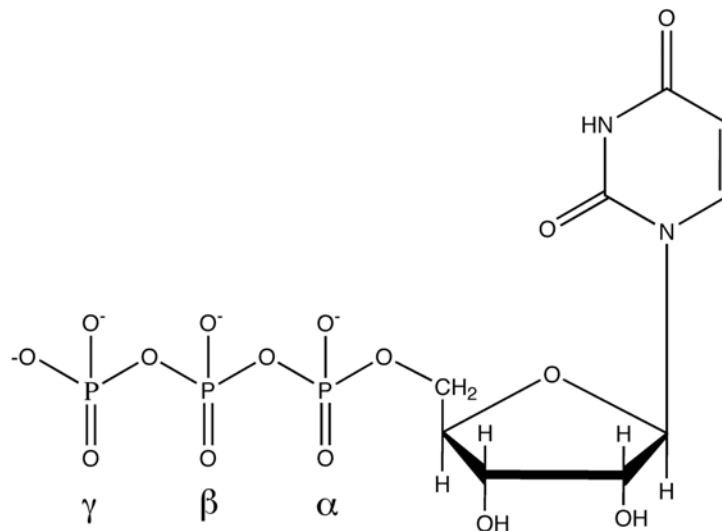


Abbildung 2.4: Strukturformel von Uridyltriphosphat (UTP). Für die radioaktive Markierung ist das α -Phosphat durch ein ^{32}P ersetzt. Beim Einbau in die Nukleinsäure werden die β - und γ -Phosphate abgespalten. Die für den Einbau benötigte Energie wird durch die Trennung der energiereichen Bindungen ($\text{P}_\alpha - \text{P}_\beta$) erzeugt.

FA-Probenpuffer

80% (v/v)	Formamid
0,02% (v/v)	Xylenyanol
0,02%	Bromphenolblau

2.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

2.4.1 Theoretischer Hintergrund

Um die durch die RNA-Polymerase III transkribierten RNA-Moleküle analysieren zu können, werden die gefällten Proben auf einem denaturierenden Polyacrylamidgel (s. Abb. 2.5) aufgetragen. Dieses Gelsystem enthält das Wasserstoffbrücken brechende Agens Harnstoff in einer Konzentration von 8 mol/l. Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird meist für die Trennung von Nukleinsäuren < 1000 bp verwendet und dient häufig zur Analyse von Promotoraktivitäten, Restriktionsfragmenten, DNA-Sequenzierung und zur Auftrennung und Reinigung von Oligonukleotiden. Ebenso wie bei den Agarosegelen kann durch die Variation der Acrylamidkonzentration der Trennbereich für die unterschiedlichen Fragmentlängen optimiert werden (s. Tabelle 2.1). Dabei muss beachtet werden, dass doppelsträngige Moleküle in nativen Gelsystemen und einzelsträngige Nukleinsäuren in denaturierenden Gelsystemen untersucht werden.

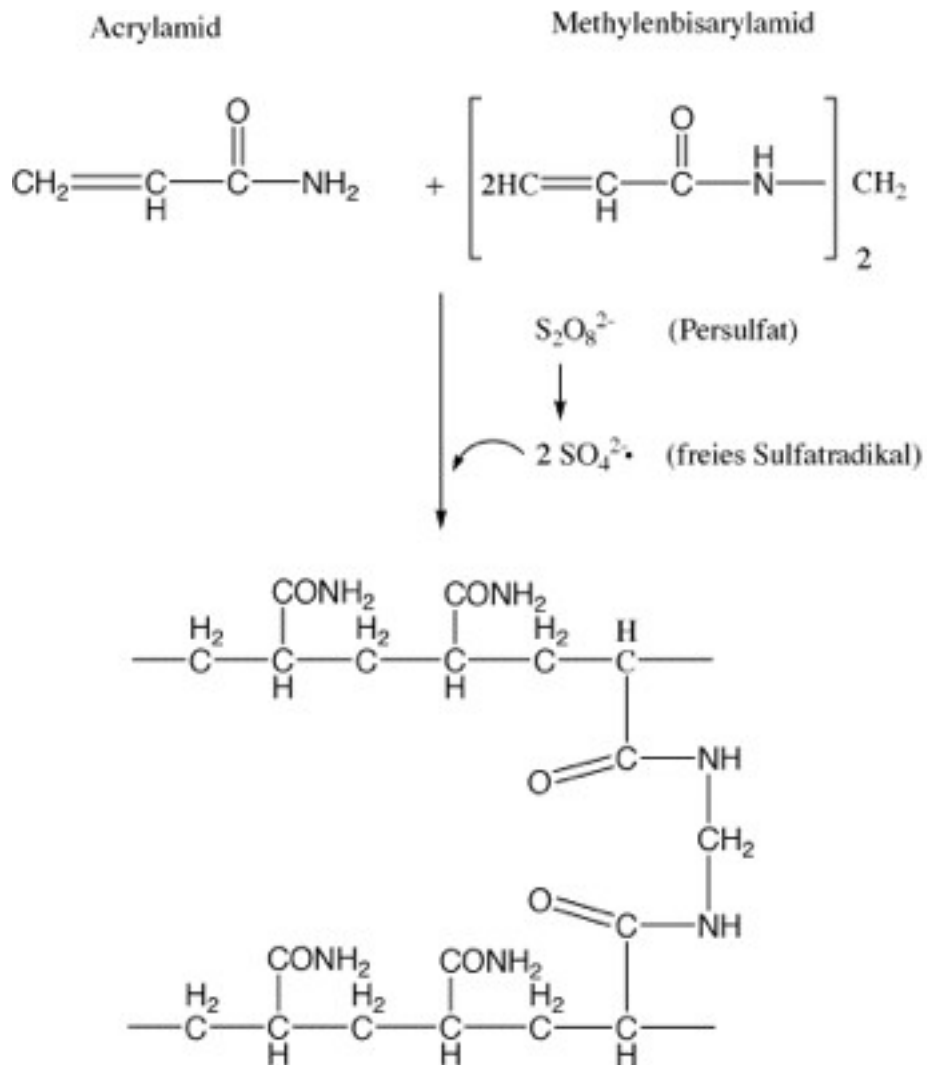


Abbildung 2.5: Vernetzung von Acrylamid und Bisacrylamid in einem PAA-Gel.

Tabelle 2.1: Acrylamidkonzentrationen für optimale Auflösungen von Nukleinsäuren in denaturierenden Polyacrylamidgelen. Die Zahlen in den Spalten 3 und 4 geben in etwa die Größe der Fragmente einzelsträngiger Nukleinsäuren an (in nt), deren Wanderungsverhalten dem des jeweiligen Farbstoffs entspricht.

Acrylamid- konzentration [%]	Kettenlänge [bp]	Bromphenolblau	Xylenxanol
3,5	1000-2000	460	100
5,0	80-500	260	65
8,0	60-400	160	45
12,0	40-200	70	20
15,0	25-150	60	15
20,0	6-100	45	12

Während der *in vitro*-Transkription werden die α - ^{32}P -dUTPs in die Transkripte eingebaut und können daher im Autoradiogramm nachgewiesen werden. Dabei muss beachtet werden, dass nur ein geringer Prozentsatz der radioaktiven Nukleotide umgesetzt wird. Die nicht eingebauten Nukleotide werden zum Teil mit ausgefällt und anschließend mit auf das Gel aufgetragen. Die kleinen Nukleotide durchlaufen das Gel um ein Vielfaches schneller und sind im Anschluss an die Gelelektrophorese im Laufpuffer in der Gelapparatur zu finden. Sie können leicht mit einem Messgerät nachgewiesen werden. Der Laufpuffer muss aus diesem Grund gesondert entsorgt werden.

Für eine autoradiographische Analyse müssen die Nukleinsäuren im Acrylamidgel fixiert werden. Dazu wird das Gel in Essigsäure inkubiert und anschließend getrocknet.

2.4.2 Lösungen für die Polyacrylamid-Gelelektrophorese

1× TBE-Puffer		Rezept:	
90 mM	Tris-Borat pH 8,0	10× TBE	100 ml
2 mM	EDTA	H ₂ O	ad 1000 ml

3. Radioaktives Arbeiten

3.1 Eingesetzte Radioaktivität

Die bei der *in vitro*-Transkription erhaltenen RNAs werden durch den Einbau von radioaktivem ^{32}P markiert, um sie leicht detektierbar und quantifizierbar zu machen. Dies geschieht durch den Einsatz von α - ^{32}P -UTP bei der Transkription. Dabei wurde das Phosphoratom des α -Phosphats des UTPs durch ein radioaktives ^{32}P ersetzt (s. Abb. 2.4).

Bei diesem Isotop handelt sich um einen β -Strahler, der Elektronen (e^-) emittiert und dabei zu ^{32}S zerfällt. Die maximale Energie beträgt 1,6 MeV und die meisten Elektronen emittieren mit einer mittleren Energie von 0,6 MeV. Diese Eigenschaften machen ^{32}P zu einem gut messbaren Isotop, da schon geringe Mengen mit Hilfe eines Szintillationszählers nachgewiesen werden können. Mit Plexiglas einer Dicke von 0,9 cm kann die Strahlung vollständig abgeschirmt werden. ^{32}P hat eine Halbwertszeit von ca. 14 Tagen, d.h. nach 14 Tagen ist die Hälfte der ursprünglichen Aktivität abgeklungen.

3.2 Umgang mit Radioaktivität

Alle Arbeiten mit radioaktiven Stoffen erfolgen im Zentralen Isotopenlabor (ZIL). Dort sind vor Betreten der Räumlichkeiten Schutzkittel und Überschuhe anzuziehen (werden gestellt). Vor Verlassen des ZIL muss jeder auf dem Kontaminationsmonitor auf mögliche Kontaminationen überprüft werden (auch diejenigen, die nicht direkt mit Radioaktivität gearbeitet haben). Zusätzlich erhält jede Person, die das ZIL betritt, ein Dosimeter, welches die radioaktive Dosis, der diese Person während der Arbeiten im ZIL ausgesetzt ist, überwacht. Die eigentlichen radioaktiven Experimente finden ausschließlich im Labor des ZIL statt. Der Transport von Radioaktivität über die Flure des ZIL und innerhalb des Labors erfolgt nur in den dafür vorgesehenen Plexiglasbehältern. Bei der Arbeit mit radioaktiven Stoffen sind Handschuhe und Schutzbrillen zu tragen. Sämtliche Arbeiten erfolgen hinter entsprechenden Plexiglas-Schutzplatten, welche an jedem Arbeitsplatz vorhanden sind. Abfall (Pipettenspitzen, Eppis, Lösungen, etc.) sind in den entsprechenden Plexiglasbehältern zu entsorgen. Vor der Arbeit mit Radioaktivität ist darauf zu achten, dass an jedem Arbeitsplatz ein eingeschalteter Szintillationszähler vorhanden ist, um mögliche Kontaminationen frühzeitig detektieren zu können. Kontaminationen am Arbeitsplatz können mit Hilfe einer Waschlösung gesäubert werden. Kontaminierte Handschuhe sind in die Behälter für radioaktiven Abfall zu entsorgen und gegen saubere Handschuhe auszutauschen, **ohne damit andere Gegenstände (auch nicht den Szintillationszähler!) zu berühren**. Aus diesem Grund empfiehlt es sich, bei allen Arbeiten eine Hand frei von Radioaktivität zu halten, um damit z.B. einen kontaminierten Handschuh der anderen Hand ausziehen zu können. **Die Handschuhe sind vor Verlassen des Labors auszuziehen.**

4. Versuchsdurchführung

4.1 S100-Extraktion aus HEK-Zellen

Vier Zellkulturschalen mit HEK Zellen werden mit einem Zellschaber geerntet. Nach dem Abschaben der Zellen werden diese mit insgesamt 8 ml PBS-Puffer aus den Zellkulturschalen gespült und in ein 15 ml-Spitzbodengefäß überführt. Nach erneuter Zentrifugation in der Minifuge bei 2200 rpm für 10 min wird der Überstand abpipettiert und das gepackte Zellvolumen (PCV = *packed cell volume*) durch Vergleich gegen ein Spitzbodengefäß gleicher Füllhöhe mit Wasser bestimmt (PCV1). Zu dem Zellsediment wird das 5fache Volumen von PCV1 an Puffer A gegeben und vorsichtig mit einer 5 ml-Glaspipette resuspendiert. Die Zellen werden für 10 min bei 2500 rpm in der Minifuge zentrifugiert. Der Überstand wird mit einer Pipette abgenommen und wie oben das PCV bestimmt (PCV2). Zu dem Sediment wird das 2fache Volumen von PCV2 an Puffer A gegeben (das Gesamtvolumen darf 5 ml nicht überschreiten), und die Zellen werden vorsichtig resuspendiert. Die Suspension wird mit einer Pipette in einen *Douncer* überführt (Gesamtvolumen dabei bestimmen: V_{ges}) und für 10 min auf Eis stehen gelassen. Die Zellen werden durch 30 Stöße mit dem B-Pistill lysiert (auf keinen Fall darf sich Schaum bilden!). Danach wird $\frac{1}{10}$ Volumen von V_{ges} an $10\times$ Puffer B in den *Douncer* gegeben und mit 2 – 3 Stößen vermischt. Die Suspension wird in ein Zentrifugengefäß gegeben (ca. 4,5 ml), wobei das Zentrifugengefäß bis kurz unter den Rand befüllt sein muß! Nach dem Austarieren gegenüberliegender Zentrifugenröhrchen (inklusive *buckets* und Deckel) mit der verbleibenden Suspension wird für 1 h bei 4°C und 30000 rpm (ca. 100000 \times g) zentrifugiert. Anschließend werden die Röhrchen auf Eis gestellt und die Lipidschicht wird mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Der Extrakt wird mit einer 1000 μ l-Pipette bis ca. 5 mm zum Kernsediment abgenommen und in ein Greinergefäß gegeben. Anschließend wird der Extrakt in einen Dialyseschlauch pipettiert und unter ständiger Kühlung auf Eis dreimal gegen je 250 ml Puffer D für jeweils 45 min dialysiert. Das Dialysat wird in 2 ml-Reaktionsgefäße gegeben und 5 min bei voller Geschwindigkeit im Kühlraum in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (auf NC6/Süd). Der Extrakt wird in neue 1,5 ml-Reaktionsgefäße pipettiert. Desweiteren werden zweimal 100 μ l des Extraktes in jeweils ein separates Reaktionsgefäß gegeben. Eines dieser Aliquots wird am Folgetag für die *in vitro*-Transkription verwendet das andere für die nachfolgende Proteinbestimmung (siehe 4.2).

Die Extrakte, welche heute nicht mehr benötigt werden, werden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C über Nacht gelagert.

4.2 Proteinbestimmung mittels der Bradford-Methode

Die Menge an isoliertem Protein ist ein Mass für die bisher geleisteten Arbeiten. Für eine erfolgreiche *in vitro*-Transkription ist ein guter Extrakt mit hohen Proteinkonzentrationen essentiell. Daher werden die Proteinmengen mittels einer Bradford-Kalibrierkurve bestimmt. Dazu werden folgende Konzentrationen (in μg) aus einer 10 mg/ml konzentrierten Stammlösung BSA (*Bovine Serum Albumin*) erstellt: 2, 4, 6, . . . , 18, 20, 25, 30. Für eine möglichst genaue Kalibrierkurve wird zunächst eine angemessene Vorverdünnung der BSA-Stammlösung hergestellt, aus der alle zu messenden Konzentrationen angesetzt werden. Die Bestimmung erfolgt mittels eines Photometers bei 595 nm in einer Plastikkuvette, wozu je 1 ml Lösung benötigt wird. Die Bradford-Stammlösung ist 5 \times konzentriert und wird als letztes zugegeben.

Die Proben zur Proteinbestimmung werden in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen angesetzt. Nach der Zugabe des Bradford-Reagenzes müssen die Flüssigkeiten gut vermischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert werden. Anschließend wird die Standardreihe ausgehend von der kleinsten Konzentration hin zur höchsten in derselben Küvette gemessen.

Von dem S100-Extrakt wird jeweils eine 3er-Bestimmung mit 2 μl des Extraktes durchgeführt.

Tabelle 4.1: Proteinbestimmung nach Bradford.

μg BSA	BSA-Verdünnung [μl]	Wasser [μl]	5 \times Bradford [μl]	E_{595}
0				
2				
4				
6				
8				
10				
12				
14				
16				
18				
20				
25				
30				
Probe 1				
Probe 2				
Probe 3				

4.3 *in vitro*-Transkription

Bis auf den Extrakt und das α - ^{32}P -UTP werden alle Komponenten vorgelegt (vgl. Tabelle 4.2). Im Isotopenlabor wird das α - ^{32}P -UTP zugegeben und die Transkription durch Zugabe des Extraktes gestartet. Die Transkription erfolgt bei 30°C im Heizblock für 60 min.

Tabelle 4.2: Pipettierschema für die *in vitro*-Transkription.

Gruppe	A	B	C	D	Kontrolle
Lösungen	7SK	hU6	7SL	VA	Eber II
Plasmid (c = 0,5 µg/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
Transkriptionspuffer 1	---	---	5 µl	5 µl	5 µl
Transkriptionspuffer 2	5 µl	5 µl	---	---	---
50 mM NTP-Mix	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
10 mM DTT	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
α-Amanitin (c = 10 µg/ml)	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
α-^{32}P-UTP (2,5 µCi/µl)	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl	2 µl
HEK-S100-Extrakt	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
H₂O	19 µl	19 µl	19 µl	19 µl	19 µl
Gesamt	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl

Nach Ablauf der Reaktionszeit wird die *in vitro*-Transkription durch Zugabe von 50 µl PK-Puffer gestoppt. Der Verdau der Proteine erfolgt durch eine 45minütige Inkubation bei 37°C. Danach werden die Nukleinsäuren durch Zugabe von 33 µl 10 M Ammoniumacetat und 2,5 Volumen (250 µl) Ethanol in der Tischzentrifuge gefällt (10 Min). Anschließend wird das Sediment mit 1000 µl 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert, im Membranpumpenvakuum getrocknet und schließlich in 30 µl FA-Probenpuffer aufgenommen.

4.4 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zuerst werden die Gelplatten, *Spacer* und Kämmen gründlich gereinigt, und anschließend zusammengebaut. Danach wird die Stammlösung für das 6%ige PAA-Gel nach Tabelle 4.3 hergestellt. Die erhaltenen 40 ml werden aufgeteilt, so daß ca. 10 ml für das Stopfgel und 30 ml für das Laufgel verwendet werden.

Zum Starten der Polymerisierungsreaktion des Stopfgels werden der Lösung 75 µl 20% APS und 75 µl TEMED zugeführt. Nach der Zugabe der beiden Substanzen, wird ohne

Verzögerung das Stopfgel gegossen. Der Vorgang beim Laufgel verläuft analog, nur daß die Lösung zuvor entgast wird und daß 100 µl 20% APS und 75 µl TEMED verwendet werden.

Tabelle 4.3: Zusammensetzung eines 6%igen PAA-Gels. Da der Harnstoff schlecht löslich ist, sollte man die Lösung für eine Weile bei ca. 45°C im Wasserbad inkubieren.

Menge	Chemikalie/Lösung
19,2 g	Harnstoff (kristallin)
6 ml	40% Acrylamid (2% Bisacrylamid)
4 ml	10× TBE-Puffer
ad 40 ml	H ₂ O

Vor dem Auftragen der Proben auf das Gel werden die Proben 5 min auf 95°C erhitzt. Die transkribierten RNAs können dann auf dem denaturierenden 6%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt werden. Anschließend wird das Gel 10 min in 7%iger Essigsäure fixiert und auf einem Geltrockner im Vakuum getrocknet. Auf das Gel wird eine Phosphoimagerplatte 20 min aufgelegt, anschließend wird die Phosphoimagerplatte gescannt und ausgewertet. Zusätzlich wird ein Röntgenfilm über Nacht aufgelegt und am nächsten Tag entwickelt.

5. Literatur

- Bradford, M.M.; A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254
- Bredow, S., Sürig, D., Müller, J., Kleinert, H., Benecke, B.-J.; Activating-transcriptionfactor (ATF) regulates human 7SL RNA transcription by RNA polymerase III *in vivo* and *in vitro* (1990) *Nucl. Acids Res.* **18**, 6779-6784
- Chambon, P.; Eukariotic nuclear RNA polymerases (1975) *Annu. Rev. Biochem.* **44**, 613-635
- Das, G., Henning, D., Wright, D., Reddy, R.; Upstream regulatory elements necessary and sufficient for transcription of a U6 RNA gene by RNA polymerase III (1988) *EMBO J.* **7**, 503-512
- Engelke, D.R., Hg, S.-Y., Shastry, B.S., Roeder, R.G.; Specific interaction of a purified transcription factor with an internal control region of 5S RNA genes (1980) *Cell* **19**, 717-728
- Galli.G., Hofstetter, H., Birnstiel, M.L.; Two conserved sequence blocks within eukaryotic tRNA genes are major promoter elements (1981) *Nature* **294**, 626-631
- Hayes J.J., Tullius, T.D., Wolffe, A.P.; A protein-protein interaction is essential for stable complex formation on a 5S RNA gene (1989) *J.Biol.Chem.* **264**, 6009-6012
- Howe, J.G., Shu, M.-D., Upstream basal promoter element important for exclusive RNA polymerase III transcription of the EBER 2 gene (1993) *Mol. Cel. Biol.* **13**, 2655-2665
- Kovelman, R., Roeder, R.G.; Purification and characterization of two forms human transcription factor IIIC (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 24446-24456
- Kassavetis, G.A., Joazeiro, C.A.P., Pisano, M., Geiduschek, E.P.; The role of TATA-binding protein in the assembly and function of the multisubunit yeast RNA polymerase III transcription factor (1992) *Cell* **71**, 1055-1064
- Kunkel, G.R., Danzeiser, D.A.; Formation of template committed complex on the promoter of gene for the U6 small nuclear RNA from the human requires multiple sequence elements, including the distal region (1992) *J.Biol.Chem.* **267**, 14250-14258
- Kleinert, H., Benecke, B.-J.; Transcription of human 7 S K DNA *in vivo* and *in vitro* is exclusively controlled by an upstream promoter (1988) *Nucl. Acids Res.* **16**, 1319-1331
- Pieler, T., Appel, B., Oei S.-l., Mentzel H., Erdmann, V.A.; Point mutational analysis of the *Xeopus laevis* 5S gene promoter (1985) *EMBO J.* **4**, 1847-1853
- Wang, Y., Jensen, R.C., Stumph, W.E.; Role of TATA box sequence and orientation in determining RNA polymerase II/III transcription specificity (1996) *Nucl. Acids Res.* **24**, 3100-3106

6. Anhang

6.1 Protokolle

Im Nachfolgenden wird ein wenig der Aufbau und Inhalt des zu diesem Versuch zu schreibenden Protokolls erläutert. **Jeder Praktikumssteilnehmer hat ein eigenes Protokoll vorzulegen!**

6.1.1 Allgemeine Hinweise

- Das Protokoll ist mit einem Computer anzufertigen (es werden nur in absoluten Ausnahmefällen handschriftliche Protokolle angenommen)!
- Es ist eine Standardschrift (z.B. Time New Roman) in einer gut lesbaren Schriftgröße (12 pts) zu wählen.
- Der Zeilenabstand sollte mindestens das 1,3fache der Zeilenhöhe betragen.
- Es gilt einen ausreichenden Randabstand einzuhalten (2 cm auf jeder Seite).
- Blocksatz verwenden!
- Die Seiten des Protokolls sind zu nummerieren und ein dazu passendes Inhaltsverzeichnis ist zu erstellen.
- Zwischen Zahlen und Einheiten gehören Leerzeichen. Dabei ist darauf zu achten, daß die Einheit nicht durch einen Zeilenumbruch in die nächste Zeile rutscht (am besten geschütztes Leerzeichen verwenden: in Microsoft Word entspricht das der Tastenkombination STRG + SHIFT + LEERTASTE).
- Auf einheitliche Schreibweise von zusammengesetzten Begriffen achten (z.B. *in vitro*-Transkription).
- Nach Möglichkeit keine fremdsprachigen Begriffe verwenden.
- Sind fremdsprachige Begriffe unumgänglich, so sind diese kursiv zu schreiben (z.B. *in vitro*).
- „Laborslang“ vermeiden! Ein Gel wird nicht „gefahren“!
- Abkürzungen müssen bei erstmaligem Gebrauch ausgeschrieben werden.

6.1.2 Gliederung des Protokolls

Ein Protokoll sollte gegliedert sein in:

- Titelblatt
- Inhaltsverzeichnis

- ggf. Abkürzungsverzeichnis*
- Zusammenfassung der Ergebnisse
- Einleitung
- Material und Methoden / Durchführung*
- Ergebnisse
- Diskussion
- Literaturhinweise
- Anhang

Die mit „*“ gekennzeichneten Unterpunkte können im Protokoll für diesen Versuchsteil weggelassen werden, da diese Punkte bereits sehr ausführlich im Skript behandelt wurden. Nachstehend werden nur die verbleibenden Unterpunkte etwas näher erläutert.

6.1.3 Titelblatt

Das Titelblatt sollte den Titel des Versuchs, den Namen des Autors (evtl. seine E-Mail-Adresse), die Praktikumsgruppe, das Versuchs- und das Abgabedatum beinhalten.

6.1.4 Inhaltsverzeichnis

Spricht für sich.

6.1.5 Zusammenfassung

In einer kurzen Zusammenfassung (maximal eine halbe Seite) sollen die Fragestellung bzw. Aufgabenstellung sowie die wichtigsten Ergebnisse und die daraus zu ziehenden Schlußfolgerungen dargestellt werden.

6.1.6 Einleitung

Die Einleitung soll den theoretischen Hintergrund und die wichtigsten Informationen über das Versuchsobjekt beinhalten. Dabei soll insbesondere auf die Eigenschaften des Versuchsobjekts eingegangen werden, die im Verlauf des Versuches und für das Verständnis und die Einordnung der Ergebnisse von besonderer Bedeutung sind. Nicht relevante Informationen sind zu vermeiden. Konkret bedeutet das, daß die wichtigsten Information dem Skript zu entnehmen sind und mit eigenen Worten wiedergegeben werden sollen (Länge der Einleitung 1 – max. 2 Seiten).

6.1.7 Ergebnisse

Die Ergebnisse der einzelnen Versuchsteile sind in Schrift und Bild darzustellen, d.h. an geeigneter Stelle im Text wird auf die jeweilige Tabelle oder Abbildung verwiesen. Im Text soll erklärt werden, was auf den Abbildungen zu sehen ist. Bei Angabe von Mittelwerten wird die Anzahl der Messungen (n) und wenn möglich die Standardabweichung bzw. den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. In unserem Versuch wird das z.B. bei der Proteinbestimmung nötig. Die Werte aller Gruppen werden gesammelt und für jeden Meßpunkt der Kalibrierkurve wird daraus ein Mittelwert mit SEM berechnet.

$$SEM = \frac{\sigma}{\sqrt{n}} \quad \begin{array}{l} \text{mit } \sigma = \text{Standardabweichung} \\ n = \text{Anzahl der Meßwerte} \end{array}$$

Der Satz „Die Ergebnisse entsprechen den Erwartungen.“ ist verboten! Unbedingt muß natürlich gesagt werden, wie die Erwartungen waren und warum sie so waren.

Material/Methoden- und Ergebnisteil sollten möglichst strikt getrennt sein. Methoden sollen also nicht erst im Ergebnisteil erklärt werden. Der Methodenteil soll keine Angaben über im einzelnen durchgeführte Experimente enthalten (welche DNA mit welchem Restriktionsenzym geschnitten wurde etc.), diese Angaben gehören in den Ergebnisteil. Ebenso sollen Ergebnisteil und Diskussion möglichst strikt getrennt sein; im Ergebnisteil werden tatsächlich nur die Ergebnisse der Versuche dargestellt, ohne sie zu interpretieren oder Schlußfolgerungen aus den Ergebnissen zu ziehen.

6.1.8 Diskussion

Die Diskussion ist neben dem Ergebnisteil der wichtigste Teil der Arbeit. In der Diskussion werden die erhaltenen Ergebnisse nur kurz zusammengefaßt und ausführlich interpretiert. Dabei werden Schlußfolgerungen aus den Daten gezogen und nach Möglichkeit mit Literaturdaten verglichen. Bei fehlgeschlagenen Versuchen bzw. nicht interpretierbaren Ergebnissen sollen die möglichen Fehlerquellen diskutiert werden.

6.1.9 Abbildungen

Abbildungen werden durchnummeriert und mit einer Abbildungsunterschrift versehen. Eine Abbildung muß auch ohne den Text zu verstehen sein, d.h. sie muß ordentlich beschriftet sein (bei einem Gel z.B. die Spuren beschriften und die Größe der Markerbanden angeben, bei Diagrammen müssen die Achsen beschriftet werden). Die Abbildungsunterschrift soll sich deutlich vom Fließtext abheben, daher empfiehlt es sich, eine kleinere Schrift zu verwenden

und einen ausreichenden Abstand zum Fließtext einzuhalten. Bei nicht selbst erstellten Abbildungen ist in jedem Fall die Quelle anzugeben.

6.1.10 Tabellen

Für Tabellen gilt das gleiche wie für Abbildungen. Oft empfiehlt es sich, anstelle einer Tabelle eine Abbildung im Ergebnisteil darzustellen. Zu einem Sachverhalt oder Ergebnis eine Abbildung und eine Tabelle darzustellen ist dagegen nur in wenigen Fällen sinnvoll.